



# دستور العمل آزمایشگاه هما تولوژی

## دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی

## گروه علوم آزمایشگاهی

## دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

### مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

خون گرفته شده بر روی ضد انعقاد EDTA ، محلول مارکانو، لام نیوبائر، لام سنگی، لوله آزمایش،

جالوله ای، سمیلر 200μl، سر سمیلر، پییت 5CC، میکروسکوپ

## روش کار:

در یک لوله آزمایش به مقدار ۳/۸ml محلول مارکانو می ریزیم . سپس مقدار ۲۰۰μl از خون حاوی ماده

**ضد انعقاد را به آن می افزاییم.**

به آرامی و از کنار لامل، توسط سمپلر، از محلول رقیق شده، نمونه را بین لام و لامل کاملاً پخش می

نماییم. بعد از حدود ۲ دقیقه، لام را زیر میکروسکوپ گذاشته، با کندانسور بسته و عدسی ۱۰ عمل

شمارش را در ۴ مربع کنار لام، انجام میدهیم.

A blank sheet of graph paper featuring a uniform grid of squares. The grid consists of 10 columns and 10 rows, creating a total of 100 small square units. The lines are thin and black, set against a white background. There are no margins or additional markings on the page.

بعد از اتمام شمارش، حاصل WBC های ۴ خانه را با هم جمع کرده و در فرمول زیر قرار می دهیم:

$20 \times \frac{2}{5} \times \text{تعداد WBC شمرده شده } 4 \text{ خانه} = \text{تعداد WBC در } 1\text{mm}^3$

$$1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} \times 4 = 0.4\text{mm}^3$$

$$1\text{mm}^3 \rightarrow 0.4 \times 2.5 = 1$$

در لکوپنی ها خون را ۱/۱۰ رقیق می کنیم  $\text{WBC} \leq 2500$

و در لکوسیتوز خون را ۱/۲۰۰ یا ۱/۱۰۰ رقیق می کنیم.

$$\text{WBC} \times 100 \text{ شمرده شده} = \text{فرمول تصحیح شمارش WBC}$$

$$\text{NRBC} + 100$$

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پیراپزشکی

گروه علوم آزمایشگاهی

دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

خون گرفته شده بر روی ضد انعقاد، محلول هاتم، لوله آزمایش، جالوله ای،

سمپلر 20µl، سرسمپلر، پیپت 5CC، لام نئو بائر، لامل سنگی، میکروسکوپ

روش کار:

یک لوله آزمایش برداشته و مقدار ۳/۹۸ سی سی از محلول هاتم در آن می ریزیم . سپس 20µl از خون حاوی ضد انعقاد را برداشته و با آن مخلوط می کنیم . لام نئو بار با لامل سنگی تمیزی را برداشته و از محلول رقیق شده، بین لام و لامل را به آرامی با کمک سمپلر، پر می کنیم . بعد از چند دقیقه، لام را زیر میکروسکوپ گذاشته، با کنداستور تقریباً بسته و عدسی با بزرگنمایی کم، تعداد ۵ خانه از مربع وسط لام نئو بائرا می شماریم. سپس طبق فرمول زیر RBC ها را در Imm3 محاسبه می کنیم.

$$\text{تعداد RBC های ۵ خانه} = \text{مجموع RBC های ۵ خانه} \times 25 \times 10 \times 200$$

تعداد خانه های شمرده شده ۵ خانه

طرز تهیه محلول هاتم:

32g سیترات سدیم + 10ml فرمالین ۴۰٪ و محلول حاصل را با آب مقطر به حجم یک لیتر می رسانیم.

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پیراپزشکی

گروه علوم آزمایشگاهی

آزمایش: Ttal Hb

دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

خون حاوی ضد انعقاد EDTA، سمپلر 20µl، پیپت 5CC، جالوله ای، اسپکترو فتومتر، سرسمپلر، بالن ژوژه 500CC، آب مقطر، کاغذ میلی متری، کیت اندازه گیری Hb توتال شامل ۳ معرف: ۱- معرف درابکین ذخیره ۲- معرف سیانید ذخیره ۳- استاندارد هموگلوبین 20g/dL، ماژیک یا برچسب لوله آزمایش.

روش کار:

ابتدا معرف ها را آماده می کنیم:

محتویات ویال ۱ و ۲ را به بالن ژوژه 500 میلی لیتری ریخته و با آب مقطر به حجم می رسانیم. این محلول در شیشه رنگی و در حرارت آزمایشگاه تا ۳ ماه پایدار است محلول درابکین زرد و شفاف است جذب آن در طول موج 540 نانومتر، صفر خوانده می شود. در صورت مشاهده کدورت و یا بی رنگ شدن، آنرا دور بریزید. این محلول، محلول آماده درابکین می باشد. ۵ لوله را شماره گذاری کرده و داخل جالوله ای می گذاریم. و به ترتیب جدول زیر عمل می کنیم

شماره لوله	استاندارد هموگلوبین	محلول آماده درابکین	ارزش استاندارد
۱	0	5CC	0
۲	2CC	3CC	8
۳	3CC	2CC	12
۴	4CC	1CC	16
۵	5CC	0	20

محتویات لوله ها را مخلوط کرده و جذب آنها را در مقابل بلانک (لوله شماره ۱) در 540 نانومتر قرائت می نمایم سپس بر روی کاغذ میلی متری، در محور افقی ارزش استاندارد و بر روی محور عمودی، جذب را یادداشت می کنیم بعد از رسم منحنی بر روی خون گرفته شده به روش زیر آزمایش را انجام می دهیم.

در یک لوله آزمایش 5cc محلول آماده درابکین و 20µl خون تام می ریزیم. خوب مخلوط کرده و پس از ۵ دقیقه جذب آنرا در مقابل محلول درابکین در طول موج 540 نانومتر قرائت می کنیم.

مقدار Hb توتال در صورت استفاده از کووت 1cm<sup>3</sup> به صورت زیر محاسبه می شود:

gr/dL هموگلوبین توتال =  $\frac{36}{8} \times$  جذب تست

مقادیر نرمال:

مردان ۱۳ تا ۱۸ گرم درصد

زنان ۱۱ تا ۱۶ گرم درصد

نوزادان ۱۴ تا ۲۳ گرم درصد

از تماس معرف ها بدلیل داشتن سیانور با پوست و دهان جلوگیری کنید.

نوک سمپلر را بعد از برداشتن خون با گاز تمیز کنید.

معرف ها باید به دمای آزمایشگاه برسند.

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پیراپزشکی

گروه علوم آزمایشگاهی

آزمایش: G6PD

دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

خون حاوی ضد انعقاد EDTA یا هپارین، سمپلر 20µl، پیپت 1CC، لوله آزمایش، جالوله ای،  
آب مقطر، سرسمپلر، پیپت 1CC اتو 37C، معرف ها شامل سوبسترا، بافرتریس، معرف A و روغن معدنی

**روش کار:**

ابتدا درون یک لوله همولیز، 1CC آب مقطر می ریزیم، سپس 20µl از خون را به آن اضافه کرده و  
اجازه می دهیم تا خون لیز و یکدست شود.

**\* در صورتیکه میزان هموگلوبین فرد، کمتر یا بیشتر از 15gr/dL باشد، طبق فرمول زیر به لوله**

**محتوی آب مقطر، خون اضافه می نماییم. 0.3/Hb**

درون ویال حاوی سوبسترا 200µl بافر و یک قطره معرف A اضافه می کنیم.

سپس 0.5CC از خون لیز شده مرحله قبل برداشته و به یال اضافه می کنیم و به آرامی مخلوط می کنیم و  
سریعاً روغن معدنی به آن می افزاییم تا سطح مایع کاملاً پوشانده شود و در تماس با هوا نباشد. . بلافاصله  
ویال را در اتو 37C قرار داده و یک ساعت زمان می گیریم. در طی این مدت نباید ویال را تکان دهیم یا در  
معرض نور قرار دهیم.

**طریقه گزارش نتیجه به صورت زیر است.**

تغییر رنگ از آبی به قرمز بین ۱۰ الی ۶۰ دقیقه ← نرمال

عدم تغییر رنگ تا بعد از ۶۰ دقیقه ← کمبود کامل یا جزئی آنزیم

در صورت تغییر رنگ معرف A از زرد به سفید، از مصرف آن خودداری کنید.

میزان بالای رتیکولوسیت، پلاکت، لوسمی و مصرف برخی داروها، باعث خطا در آزمایش خواهد شد. محتویات  
و یالها سمی و محرک هستند و بعلت وجود ماده نگهدارنده، سرطانزا هستند. در صورت تماس با پوست، با  
آب جاری شستشو دهید و از تنفس آن خودداری کنید. از یخ زدن نمونه یا نگهداری همولیزات خودداری کنید.

دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی

آزمایش: شمارش رتیکولوسیت

دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

خون تام گرفته شده بر روی ضد انعقاد، رنگ شمارش رتیکولوسیت، لام هماتولوژی، لوله آزمایش، جالوله ای، بن ماری 37C ،

میکروسکوپ، پیت پاسور یا سمپلر 200μl، و سرسمپلر

روش ساخت رنگ شمارش رتیکولوسیت:

100cc سرم فیزیولوژی + 0.4gr سیترات سدیم + 1gr بر لیانت کرزول بلو

روش کار:

۲ قطره ((200μl)) از رنگ رتیکولوسیت را با ۲ قطره ((200μl)) از خون در داخل یک لوله آزمایش ریخته و بعد از مخلوط

کردن، بمدت ۱۰ دقیقه در بن ماری 37C قرار می دهیم. بعد از ۱۰ دقیقه، لوله را خارج و از محتویات آن لام تهیه می نماییم .

پس از خشک شدن لام با عدسی 100 بصورت زیر شمارش را انجام می دهیم:

در ده میدان میکروسکوپی که هر میدان حدود 100 تا RBC دارد، شمارش را انجام می دهیم و در فرمول زیر قرار می دهیم:

$$\text{تعداد رتیکولوسیت‌های شمرده شده} \times \frac{100}{1000} = X (\text{درصد رتیک})$$

مقادیر مرجع:

نوزادان و یا خون بند ناف 6% - 2

بالغین 2% - 0.5



دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی

آزمایش: تعیین ESR

دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

پایه سدیمان، پیپت سدیمان((وسترگرین)) لوله، جالوله ای، سمپلر 100 $\mu$ l و سرسمپلر، پوآر

روش کار: در روش وسترگرین، خون سیاه رگی، به نسبت ۴ حجم خون و ۱ حجم ضد انعقاد تری سدیم سیترات مخلوط می شود

((می توان از سرم فیزیولوژی 9gr/dl نیز استفاده کرد))

یک لوله همولیز برداشته و 300 $\mu$ l ((0.3cc)) سیترات سدیم ۳/۲٪ در آن می ریزیم به اندازه یک پیپت وسترگرین از مخلوط

حاصل کشیده و روی پایه سدیمان قرار می دهیم . بعد از یک ساعت میزان رسوب RBC ها را در ساعت اول خوانده گزارش

می کنیم.

طرز تهیه محلول سیترات سدیم:

اگر تری سدیم سیترات حاوی ۱۱ مولکول آب باشد، 38gr در یک لیتر آب مقطر حل می کنیم.

اگر تری سدیم سیترات حاوی ۲ مولکول آب باشد: 32gr در یک لیتر آب مقطر حل می کنیم.

مقادیر مرجع:

کودکان	بیش از ۵۰ سال	کمتر از ۵۰ سال	: مردان
۰-۱۰ mm/h	۰-۱۰	۰-۲۰	
	۰-۲۰	۰-۳۰	: زنان

# دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی قزوین

## دانشکده پیراپزشکی

### گروه علوم آزمایشگاهی

#### آزمایش: تعیین Hct

#### دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

#### مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

خون تام حاوی ضد انعقاد EDTA یا هپارین، لوله موئینه هماتوکریت، خمیر هماتوکریت، خط کش قرائت

هماتوکریت، سانتیفریوژ هماترکریت

#### روش کار:

لوله های موئینه هماتوکریت را که داری طول 7CM و قطر 1mm است، برداشته و تا حدود 5cm از خون

پر می کنیم. قسمت پایین را با خمیر میکروهماتوکریت مسدود می نماییم . لوله را درون سانتیفریوژ طوری می

گذاریم که قسمت خمیر زده شده ، به سمت خارج باشد . با دور ۱۰ تا ۱۲ هزار دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه

سانتریفوژ می کنیم. سپس لوله را بر روی خط کش قرائت هماتوکریت گذاشته و نتیجه را قرائت می نماییم .

هماتوکریت معیار مناسبی برای شدت اتمی نیست چون به طور مثال در شوک متعاقب خونریزی مقدار آن

افزایش دارد و یا در حاملگی بدلیل افزایش پلاسما و رقیق شدن خون، کاهش کاذب دارد.

## دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی قزوین

### دانشکده پیراپزشکی

### گروه علوم آزمایشگاهی

آزمایش: O.F.T

### دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

### مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

آب مقطر، محلول نمک 1%، لوله های آزمایش، جالوله ای، نمونه خون گرفته شده بر روی هپارین، سانتریفوژ، پیپت،

سمپلر 100 $\mu$ l، سرسمپلر

روش کار:

تعداد ۱۶ لوله آزمایش را برداشته و از ۱ تا ۱۶ شماره گذاری می نمایم.

سپس مطابق دستور زیر عمل می نمایم

غلظت درصد	D.W	Nacl 1%	شماره لوله
۱	-	۱۰ Cc	۱
۰/۹	۱Cc	۹ Cc	۲
۰/۸	۲Cc	۸ Cc	۳
۰/۷	۳Cc	۷ Cc	۴
۰/۶۵	۳/۵Cc	۶/۵ Cc	۵
۰/۶	۴Cc	۶ Cc	۶
۰/۵۵	۴/۵Cc	۵/۵ Cc	۷
۰/۵	۵Cc	۵ Cc	۸
۰/۴۵	۵/۵Cc	۴/۵ Cc	۹
۰/۴	۶Cc	۴ Cc	۱۰
۰/۳۵	۶/۵Cc	۳/۵ Cc	۱۱
۰/۳	۷Cc	۳ Cc	۱۲
۰/۲۵	۷/۵Cc	۲/۵ Cc	۱۳
۰/۲	۸Cc	۲ Cc	۱۴
۰/۱	۹Cc	۱ Cc	۱۵
۰	۱۰Cc	-	۱۶

بعد از تهیه رقتها، از هر رقت 2cc در یک لوله آزمایش ریخته، شماره گذاری کرده و در جالوله ای قرار می

دهیم. سپس از خون تازه گرفته شده بر روی هپارین، 100  $\mu$ l به هر رقت اضافه می کنیم

بعد از ۰/۵ ساعت لوله ها را سانتریفوژ می کنیم . بالاترین غلظتی که همولیز کامل می دهد، بیشترین مقاومت

گلبولی را ارد و بالاترین رقتی (کم ترین غلظت) که همولیز شروع می شود، کم ترین مقاومت را دارد.

بطور مثال: در اختلالات همولیتیک، در ۶۵٪ لیز شروع می شود و در ۳۵٪ لیز کامل می شود.

## دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

### دانشکده پیراپزشکی

### گروه علوم آزمایشگاهی

#### آزمایش: تعیین HbA2

#### دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

#### مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

خون گرفته شده بر روی ضد انعقاد EDTA، و یا هپارین، لوله آزمایش، جالوله ای، سمپلر 100،50 و 200µl، سرسمپلر، پیپت پاستور، پیپت 5cc، آب مقطر، اسپکتروفتومتر، بافر جدا کننده HbA2، محلول همولیزانت، ستون حاوی ژل DE52، لوله آزمایش بلند

#### روش کار:

قبل از شروع کار، ستونها و معرف ها باید به دمای اتاق برسند

ابتدا باید همولیزت را به روش زیر تهیه نماییم:

50 µl، از خون گرفته شده را در داخل یک لوله آزمایش کوچک می ریزیم. سپس 250 µl، از محلول همولیزانت را به آن اضافه کرده، خوب تکان می دهیم تا خون کاملاً همولیز شود. همولیز کامل باعث افزایش صحت آزمایش است. بعد از ۵ دقیقه، همولیز کامل می شود. در غیر اینصورت به کمک فریز کردن، همولیز را کامل می کنیم. ستون حاوی ژل را برداشته ۲-۳ بار سر و ته می کنیم تا ژل از قسمت پایین به سمت بالا بیاید پس درب فوقانی ستون را باز کرده و به کمک پیپت پاستور متصل به پستانک لاستیکی، ژل داخل ستون را در مایع آن کاملاً شناور و یکنواخت می نمائیم. باید از یکنواخت شدن همه ژل در داخل محلول اطمینان حاصل کنیم. سپس درب زیرین ستون را برداشته و ستون را داخل یک لوله آزمایش قرار می دهیم تا محلول از ژل خارج شده و داخل لوله بریزد چنانچه مایع شفاف رویی در بالای ستون بماند، می توان با پیپت پاستور آنرا خارج نمود. 100 µl، از همولیزت تهیه شده در بالا را به آهستگی و با کمک یک سمپلر به سطح ژل اضافه می کنیم بطوریکه به اطراف پخش نشود. بلافاصله پس از اضافه کردن همولیزت به ژل داخل ستون، 100 µl دیگر از همولیزت را داخل یک لوله آزمایش بلند ریخته و حجم آنرا به 15cc می رسانیم (هموگلوبین توتال)) پس از گذشت ۵ دقیقه و جذب همولیزت به داخل ژل، ستون را روی یک لوله آزمایش دیگر قرار داده و به آرامی 2.5cc از محلول بافر HbA2 را به سطح ژل اضافه می کنیم. به تدریج HbA2 جدا شده و به طرف پایین حرکت می کند حلقه HbA2 در این حالت قابل مشاهده است. پس از حدود ۲۰ دقیقه، تمام بافر از ستون خارج می شود. سپس به آن 0.5CC آب مقطر اضافه کرده (به لوله حاوی HbA2) هر دو لوله را هم زده و با استفاده از اسپکتروفتومتر و طول موج 415nm و در مقابل بلانک آب مقطر، OD لوله HbA2 و لوله Hb توتال را قرائت می نماییم.

محاسبه نتیجه بر اساس فرمول زیر است:

$$\text{HbA2} \% = \frac{\text{ODHbA2}}{\text{ODHb Total}} \times 100$$

## مقادیر نرمال:

$$\text{HbA2} = \%2/2 - \%3/5$$

$\%3/5$  تا  $\%8$  بعنوان نشانه بتاتالاسمی مینور است.

بالتر از  $\%8$  نشان دهنده وجود هموگلوبین غیر طبیعی دیگر مثل S-G-D-O-E-C و یا SG است.

درجه حرارت هنگام آزمایش باید بین ۲۱ تا ۳۰ درجه باشد. در دمای پایین تر از C ۲۱ جواب پایین تری خواهید گرفت.

در مرحله آماده سازی، پس از خارج شدن محلول از ژل، ستون بیش از ۵ دقیقه نباید در معرض هوا قرار گیرد چون خشک می شود.

ستون در معرض نور مستقیم و در فریزر تحت هیچ شرایطی نباید قرار گیرد

در صورت تغییر رنگ ژل داخل ستون، آنرا دور بیندازید چون احتمال آلودگی قارچی یا میکروبی برای ژل وجود دارد.

در صورت استفاده از خون شسته و پک شده،  $25\mu\text{l}$ ، خون پک شده را با  $300\mu\text{l}$  همولیزانت مخلوط کرده و همولیزنت تهیه نمایید.

اکزالات و فلوراید ماده ضد انعقاد مناسبی نیستند.

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پی‌اپزشکی

گروه علوم آزمایشگاهی

دستورالعمل آزمایشگاه خون شناسی

آزمایش: P.T.T,PT

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز:

پلاسمای تازه، بن ماری 37C، سمپلرهای 100μl و 200μl، لوله های

سیترا ته، سرسمپلر، کور ونومتر، کلرور کلسیم، گاز، چراغ مطالعه، لوله های همولیز، ویالهای P.T.T,PT،

آب مقطر

روش کار:

ویال PT را با 4ml و ویال PTT را با 2ml آب مقطر مخلوط می کنیم.

برای PT:

200μl از محلول ترومبوپلاستین همراه شده با کلسیم را به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ C می گذاریم

سپس 100μl از پلاسما را که آنهم ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ C بوده است، به آن اضافه کرده و پس از ۸

ثانیه از بن ماری خارج می کنیم و زمان انعقاد را با کورنومتر بررسی می کنیم . این آزمایش مسیر خارجی

را بررسی می کند. ثانیه ۱۳-۱۰ PT= نرمال

برای P.T.T:

100μl از پلاسما را با 100μl سفالین که هر دو به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷C بوده اند مخلوط کرده و

بعد از 100μl کلرور کلسیم به آن می افزاییم. بعد از ۱۵ تا ۲۰ ثانیه از بن ماری خارج کرده و زیر نور چراغ

زمان لخته را با کورنومتر بررسی می کنیم.

این آزمایش مسیر داخلی را بررسی می کند. ثانیه ۴۵-۳۰ PTT= نرمال

جداسازی پلاسما:

خون سیترا ته را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژی می کنیم.